

3.2.4 Kultivierung von PLHV-1, -2 und -3

3.2.4.1 Versuche zur Virusvermehrung in Kokultivierungsexperimenten

3.2.4.1.1 Kokultivierung mit permanenten Zelllinien

Für die Kokultivierungsversuche kamen die Zelllinien ST, POEK, WSH, PK-15, MDBK, Vero, SE-R und 293 zur Anwendung. Sie wurden mit in der PCR stark viruspositiven PBMC verschiedener Schweine kokultiviert und auf ein eventuelles Viruswachstum hin untersucht.

In keinem der durchgeführten Experimente war ein deutlicher CpE in der Zellkultur zu beobachten; die Ergebnisse der Untersuchung der Zellen mittels einer virus-spezifischen PCR sind in Tabelle 12 aufgelistet. Zwar ist in einigen Ansätzen in den frühen Passagen Virus nachweisbar, doch geht dieses Signal spätestens nach Passage 4 (Tag 18) wieder verloren. Auch nach Stimulation der PBMC mit TPA, Phytohämagglutinin oder Pokeweed Mitogen konnte eine Replikation der Viren in den Zellen nicht gezeigt werden.

3.2.4.1.2 Kokultivierung mit primären Zellen

Es ist bekannt, dass einige Herpesviren *in vitro* sehr gut in primären Zellen (Fibroblasten) replizieren. Die am Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin aus Lunge und Unterhaut eines Ferkels isolierten primären Zellen – die PCR-negativ für PLHV-1, -2 und -3 waren – wurden am dortigen Institut mit frisch isolierten, PCR-positiven PBMC kokultiviert.

Bei Kokultivierung der aus der Lunge isolierten Zellen mit Blutzellen des Schweins 782 blieben diese komplett negativ; weder ein cytopathogener Effekt noch ein positives PCR-Signal wurde beobachtet. Die Zellen aus der Ferkelhaut dagegen waren zumindest in der ersten untersuchten Passage der Zellen (Passage 2) schwach positiv für PLHV-3. Schon in der nächsten untersuchten Passage waren Sequenzen des Virus allerdings nicht mehr nachweisbar [s. Tab. 13].

In einem weiteren Ansatz wurden primäre Schweinezellen mit Blutzellen des Schweins 791 kokultiviert; jeweils ein Ansatz wurde mit TPA stimuliert (20ng/ml). Zwar zeigten die Zellen später keinen klassischen cytopathogenen Effekt, doch sahen insbesondere die Ferkelhautzellen geschädigt aus. In der PCR (P-747s/as, P-905s/as) ergab sich das ebenfalls in Tabelle 13 dargestellte Bild.

Tabelle 12 Kokultivierung mit permanenten Zelllinien

Experiment	Schwein	Zelllinien		Passagezahl							
				2	3	4	5	6	7		
I ^{a, b}	139 ^c	MDBK		-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.		
		ST		((+))	-	-	-	-	-		
		Vero		-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.		
		PK-15		-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.		
II ^{b, d}	139 ^c	MDBK	TPA	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
			PHA	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
			PW	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
		ST	TPA	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
			PHA	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
			PW	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
		PK-15	TPA	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
			PHA	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
			PW	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.		
		III ^{a, e}	e ^f	POEK	PLHV-1	-	-	-	-	-	-
					PLHV-3	-	-	-	-	-	-
				WSH	PLHV-1	-	-	-	-	-	-
PLHV-3	-				-	-	-	-	-		
IV ^g	791 ^f	293 + TPA	PLHV-1	+	-	-	-	n.u.	n.u.		
			PLHV-3	+	-	-	-	-	n.u.		
		293 - TPA	PLHV-1	+	+	+	-	-	-		
			PLHV-3	+	-	-	-	-	-		
		SE-R + TPA	PLHV-1	+	-	-	-	n.u.	n.u.		
			PLHV-3	+	-	-	-	-	n.u.		
		SE-R - TPA	PLHV-1	+	+	-	-	-	-		
			PLHV-3	+	+	-	-	-	-		

PHA = Phytohämagglutinin

PW = Pokeweed Mitogen

n.u. = nicht untersucht

- = PCR negativ

(+) = PCR schwach positiv

+ = PCR eindeutig positiv

^a die PBMC wurden direkt nach ihrer Isolierung aus Frischblut mit den adhärennten Zellen kokultiviert^b die Proben wurden mit dem Primerpaar P-170s/as untersucht (Nachweis von PLHV-1 und -2)^c positiv für PLHV-2, negativ für PLHV-1 und -3^d ein Teil der PBMC wurde zur Reaktivierung der Viren zunächst für 48 Stunden mit TPA (20ng/ml), Phytohämagglutinin (5µg/ml) oder Pokeweed Mitogen (2,5µg/ml) stimuliert; erst dann wurden die PBMC sowie ihr Überstand zu den adhärennten Zellen transferiert^e die Proben wurden mit den Primerpaaren P-747s/as (Nachweis von PLHV-1 und -2) und P-905s/as (Nachweis von PLHV-3) untersucht^f positiv für PLHV-1 und -3, negativ für PLHV-2^g die PBMC wurden direkt nach ihrer Isolierung aus Frischblut mit den adhärennten Zellen kokultiviert; das Stimulans wurde erst dem Gesamtansatz hinzugefügt

Tabelle 13 Kokultivierung mit primären Zellen

Experiment	Schwein	Zellen		Passagezahl				
				2	3	4	5	
I ^a	782 ^{b, d}	FH	PLHV-1	-	n.u.	-	-	
			PLHV-3	+	n.u.	-	-	
		FL	PLHV-1	-	-	-	n.u.	
			PLHV-3	-	-	-	n.u.	
II ^c	791 ^{b, d}	FH + TPA	PLHV-1	n.u.	n.u.	-	n.u.	
			PLHV-3	n.u.	n.u.	+	n.u.	
		FH - TPA	PLHV-1	(+)	-	-	n.u.	
			PLHV-3	++	(+)	-	n.u.	
		FL + TPA	PLHV-1	-	-	-	n.u.	
			PLHV-3	-	-	-	n.u.	
		FL - TPA	PLHV-1	-	-	-	n.u.	
			PLHV-3	+	-	-	n.u.	
		FH + Ü	Z	PLHV-1	-	n.u.	n.u.	n.u.
				PLHV-3	-	n.u.	n.u.	n.u.
			Ü	PLHV-1	-	n.u.	n.u.	n.u.
				PLHV-3	-	n.u.	n.u.	n.u.

FH = Ferkelhaut

FL = Ferkellunge

Z = Zellen

Ü = Überstand

X + TPA = Zellen mit TPA stimuliert (20ng/ml)

X - TPA = Zellen nicht stimuliert

X + Ü = frische Zellen mit Überstand einer PCR-positiven Passage inkubiert

n.u. = nicht untersucht

- = PCR negativ

(+) = PCR schwach positiv

+ = PCR eindeutig positiv

++ = PCR stark positiv

^a die Zellen wurden sofort mit den frisch isolierten PBMC kokultiviert^b positiv für PLHV-1 und -3, negativ für PLHV-2^c die mit Ferkelhautzellen kokultivierten PBMC wurde direkt nach der Isolierung eingesetzt; der zweite Teil der Zellen wurde zunächst für acht Tage in RPMI 1640 kultiviert, bevor die Kokultivierung mit den Ferkellungszellen begonnen wurde^d die Proben wurden mit den Primerpaaren P-747s/as (Nachweis von PLHV-1 und -2) und P-905s/as (Nachweis von PLHV-3) untersucht

Während bei PLHV-1 ein Signal in den Ferkelhautzellen bis maximal Passage 2 erhalten wurde, konnte bei PLHV-3 in den gleichen Zellen bis zu Passage 3 bzw. 4 (= Tag 14 bzw. Tag 19) Virus nachgewiesen werden. Nach Passage 4 degenerierten die Zellen, weshalb der Versuch beendet wurde, bevor die PCR-Ergebnisse vorlagen. In allen Fällen blieben die Kontrollen (ohne PBMC kultivierte Zellen) PCR-negativ.

Um zu testen, ob es sich um eine produktive Infektion der Ferkelhautzellen gehandelt hat, wurde etwa 1ml Überstand, der bei der Passage 2 (FH - TPA) abgenommen und bei -80°C eingefroren worden war, auf frische Ferkelhautzellen gegeben und

diese im Anschluss auf eine Infektion mit PLHV-3 untersucht. Weder in den Zellen selbst noch in ihrem Überstand konnte nach einigen Tagen Kultivierung Virus mittels PCR nachgewiesen werden [s. Tab. 13].

3.2.4.2 Stimulation primärer PBMC

Diese Versuche sollten zur Klärung der Frage dienen, ob die PLH-Viren in primären PBMC *in vitro* überhaupt zu replizieren beginnen, und mittels welcher Zellstimulation man die Reaktivierung der latenten Virusgenome induzieren kann. Zur Verwendung kamen Substanzen, die bereits erfolgreich zur Anzucht von verschiedenen Herpesviren eingesetzt worden waren und zum Teil bei den in der Zellkultur schwierigen Viren (EBV, HHV-8) regelmäßig Anwendung finden. Erst nach Auswahl des wirksamsten, die Viren am effizientesten zur Replikation bringenden Stimulans sollten die Kokultivierungsexperimente unter Verwendung des ausgewählten Stimulationsweges wieder aufgenommen und die Suszeptibilität verschiedener Zelllinien untersucht werden.

Frisch isolierte PBMC von Schwein 139 (positiv für PLHV-2, negativ für PLHV-1 und -3) wurden mit den in Tabelle 14 aufgelisteten Stimulanzien in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Nach vier Tagen wurden Überstände und Zellen auf ihren Virusgehalt untersucht. Nur in der mit TPA allein stimulierten Kultur war in den

Tabelle 14 Stimulation primärer PBMC mit 5 verschiedenen Substanzen bzw. Substanzkombinationen

Stimulation	Konzentration	Überstände ^a			Zellen ^b		
		PLHV-2		β-Aktin	150ng	15ng	1,5ng
		P-170s/as	P-208s/212as	P-468s/as			
Nullkontrolle ^c	-	n.u.	n.u.	n.u.	++	+	-
unstimulierte Kontrolle	-	-	-	n.u.	++	++	+
TPA	20ng/ml	(+)	(+)	++	++	++	+
n-Butyrat	0,3mM	-	-	n.u.	+	+	-
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 0,3mM	-	-	n.u.	++	+	+
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 1mM	-	-	n.u.	++	+	-
TPA + n-Butyrat	40ng/ml + 0,3mM	-	-	n.u.	++	+	-

n.u. = nicht untersucht

- = PCR negativ

(+) = PCR schwach positiv

+ = PCR eindeutig positiv

++ = PCR stark positiv

^a die Überstände wurden nach Protokoll 1a ultrazentrifugiert und die extrahierte DNA mit Primerpaar P-170s/as untersucht

^b die angegebene Menge DNA wurde mit dem Primerpaar P-170s/as untersucht

^c zum Zeitpunkt der Isolierung der PBMC genommene Zellprobe

Überständen ein schwaches Signal erkennbar; allerdings konnte auch DNA aus dem Schweinegenom nachgewiesen werden. Es blieb somit unklar, ob die nachgewiesene Virus-DNA aus produzierten Viruspartikeln oder aus zugrunde gegangenen Zellen oder Zelltrümmern stammte, in denen das Virus nach wie vor latent vorlag. In den Zellen zeigte sich folgendes Bild: Die Menge an Virus-DNA nahm allein durch die Kultivierung der Zellen zu, wie sich im Vergleich zu der zum Zeitpunkt der Zellisolierung genommenen Probe zeigte. Die Stimulanzen bewirkten keine deutliche Verstärkung des PCR-Signals im Vergleich zu der nicht stimulierten Kontrolle. Bei den mit Butyrat stimulierten Zellen ging die Signalstärke sogar etwas zurück, was vermutlich auf die Cytotoxizität dieser Substanz zurückzuführen ist. Keines der verwendeten Stimulanzen hat eindeutig die Virusproduktion in Gang gesetzt. Ein Teil der Zellen wurde für insgesamt ca. zehn Wochen kultiviert, um eventuell eine Transformation der Zellen beobachten zu können. Diese erfolgte bis zum Versuchsende nicht. Die Zellzahl nahm beständig ab, bis in der gesamten Kultur keine lebenden Zellen mehr vorhanden waren.

Tabelle 15 Stimulation primärer PBMC mit 10 verschiedenen Substanzen bzw. Substanzkombinationen

Stimulation	Konzentration	Überstände ^c	Zellen ^d		
			150ng	15ng	1,5ng
Nullkontrolle ^a	-	n.u.	+	+	-
unstimulierte Kontrolle	-	-	+	+	-
TPA	20ng/ml	-	+	+	-
n-Butyrat	3mM	n.u.	-	-	-
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 3mM	-	(+)	-	-
Ionomycin	1µM	-	+	-	-
Ionomycin + TPA, zeitgleich	20ng/ml + 0,5µM	-	+	-	-
Ionomycin + TPA, gepulst ^b	20ng/ml + 0,5µM	-	+	-	-
Pokeweed Mitogen	2,5µg/ml	-	+	-	-
Phytohämagglutinin	10µg/ml	-	+	(+)	-
Epinephrin	1ng/ml	-	+	(+)	-
DEAE-Dextran	5µg/ml	-	+	(+)	-

n.u. = nicht untersucht

- = PCR negativ

(+) = PCR schwach positiv

+ = PCR eindeutig positiv

++ = PCR stark positiv

^a zum Zeitpunkt der Isolierung der PBMC genommene Zellprobe

^b die Zellen wurden zunächst mit TPA stimuliert; nach 10 Stunden wurde das Medium komplett durch frisches ersetzt, und diesem das Ionomycin zugefügt

^c die Überstände wurden nach Protokoll 1a ultrazentrifugiert und die extrahierte DNA mit Primerpaar P-170s/as untersucht

^d die angegebene Menge DNA wurde mit dem Primerpaar P-170s/as untersucht

Da die in diesem Versuch verwendeten Stimulanzen TPA und n-Butyrat keine Virusvermehrung induzierten, wurden in dem folgenden Versuch insgesamt zehn Substanzen bzw. deren Kombinationen eingesetzt [s. Tab. 15]. Die vier Tage lang kultivierten PBMC von Schwein 139 zeigten in der PCR ein ähnliches Bild wie in dem ersten Versuch: Keines der Stimulanzen bewirkte eine drastische Erhöhung des zellulären Virusgehaltes. Die Überstände blieben negativ.

Tabelle 16 Stimulation primärer PBMC mit 17 verschiedenen Substanzen bzw. Substanzkombinationen

Stimulation	Konzentration	Überstände ^c		Zellen ^d		
		PLHV-2	β-Aktin	50ng	5ng	0,5ng
unstimulierte Kontrolle	-	-	-	+	+	-
TPA	20ng/ml	(+)	(+)	+	(+)	(+)
n-Butyrat	3mM	-	-	+	(+)	-
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 3mM	+	+	+	+	(+)
TPA + Ionomycin, gepulst ^a	20ng/ml + 0,5μM	(+)	+	+	+	(+)
Dexamethason	5μg/ml	-	(+)	+	+	(+)
TPA + Dexamethason	20ng/ml + 5μg/ml	-	+	+	+	-
Phytohämagglutinin	10μg/ml	+	++	+	+	-
TPA + Phytohämagglutinin	20ng/ml + 10μg/ml	(+)	++	+	+	+
Cyclosporin A	1μg/ml	-	+	+	+	-
TPA + Cyclosporin A	20ng/ml + 1μg/ml	(+)	+	+	+	-
Phytohämagglutinin + Dexamethason	10μg/ml + 5μg/ml	+	++	+	(+)	-
Lipopolysaccharide	5μg/ml	-	+	+	+	-
Tumor Nekrose Faktor (TNF α) ^b	10ng/ml	(+)	+	+	(+)	-
anti-Immunglobulin-Antikörper	Verdünnung 1:500	-	-	+	-	-
Pokeweed Mitogen	2,5μg/ml	(+)	+	+	+	+
Concanavalin A	2,5μg/ml	+	++	+	(+)	-
Epinephrin	1ng/ml	-	-	+	+	-

- = PCR negativ

(+) = PCR schwach positiv

+ = PCR eindeutig positiv

++ = PCR stark positiv

^a die Zellen wurden zunächst mit TPA stimuliert; nach 10 Stunden wurde das Medium komplett durch frisches ersetzt, und diesem das Ionomycin zugefügt

^b das TNFα wurde jeden Tag neu in der angegebenen Menge supplementiert

^c die Überstände wurden nach Protokoll 1b ultrazentrifugiert und die extrahierte DNA mit den Primerpaaren P-170s/as (Nachweis von PLHV-1 und -2) sowie P-468s/as (Nachweis von β-Aktin) untersucht

^d die angegebene Menge DNA wurde mit dem Primerpaar P-170s/as untersucht

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde in einem weiteren Versuch die Zahl der verwendeten Substanzen bzw. Substanzkombinationen auf 17 ausgeweitet. Es kamen wiederum Zellen von Schwein 139 zur Verwendung, die allerdings zu einem früheren Zeitpunkt isoliert und anschließend kryokonserviert worden waren. Sie wurden nach dem Auftauen zunächst für einen Tag kultiviert und erst nach einem Mediumwechsel (Pelletieren der Zellen und Resuspension in frischem Medium) wie in Tabelle 16 aufgelistet stimuliert. Nach drei Tagen der Kultivierung konnten in den Überständen unterschiedliche Mengen von Virus-DNA nachgewiesen werden, die allerdings in guter Korrelation zu den enthaltenen Mengen zellulärer DNA standen, so dass von einem Nachweis des in zugrunde gegangenen Zellen befindlichen Virusgenoms ausgegangen werden muss.

In den Zellen zeigte sich das bereits aus den vorhergehenden Versuchen gewohnte Bild: Keines der Stimulanzien bewirkte eine eindeutige Erhöhung des Gehaltes an viralen Sequenzen [s. Tab. 16].

Um eine Virusvermehrung bzw. den Gehalt an viralen Sequenzen besser verfolgen zu können, wurde eine quantitative PCR für den Nachweis der PLH-Viren sowie des zellulären β -Aktin-Gens etabliert. Des Weiteren wurde das Protokoll für die Ultrazentrifugation der Überstände optimiert (Protokoll 2, s. Kap. 3.1.2.15.1). Unter Anwendung dieser Protokolle wurde ein weiterer Versuch mit PBMC des Schweins 791 (PLHV-1 und -3-positiv, PLHV-2-negativ) begonnen. Zusätzlich wurde hierbei auch der Gehalt an viraler RNA in den Zellen untersucht. Die verwendeten Substanzen sowie die PCR-Ergebnisse nach viertägiger Stimulation sind in Tabelle 17 aufgelistet. In den Überständen sind nur wenige Kopien bei einigen Stimulanzien nachweisbar. Das mit diesem Versuchsprotokoll beste Ergebnis wurde mit TPA + n-Butyrat erzielt, doch ist die detektierte Kopienzahl auch hier sehr niedrig. Virusgenom kann darüber hinaus in geringen Mengen bei der Stimulation mit TPA, Ionomycin, Phytohämagglutinin, Phytohämagglutinin + Dexamethason sowie Cyclosporin A detektiert werden. Bei den TPA + Dexamethason-behandelten Zellen kann im Überstand DNA sowohl von PLHV-1 wie auch vor allem von PLHV-3 nachgewiesen werden, doch ist in dieser Probe ebenfalls eine nicht unerhebliche Menge genomischer DNA nachzuweisen. Dadurch ist die Probe nicht eindeutig interpretierbar, und es muss auch hier von einem Nachweis von zellständigem (latentem?) Virusgenom ausgegangen werden.

Auf zellulärer Ebene (DNA) erwies sich in diesem Versuch die Stimulation mit TPA + Dexamethason als am effizientesten. Die Kopienzahl steigt für PLHV-1 auf das 14,2-fache der unstimulierten Zellkontrolle. Bei PLHV-3, das von Beginn an in einer weit höheren Kopienzahl vorhanden ist, steigt die Zahl der Virus-Genome auf das 7,5-fache. Eine deutliche Steigerung der Kopienzahl von PLHV-3 (>2-fach) ist auch bei Stimulation mit Dexamethason allein (2,7-fach), Cyclosporin A (2,4-fach), TPA + Cyclosporin A (2,4-fach) sowie mit dem Antikörper zu erkennen (4,5-fach). PLHV-1 ist im Vergleich dazu von anderen Stimulanzien nur in weit geringerem Umfang beeinflusst. Eine Steigerung der Kopienzahlen ist v.a. bei Stimulation mit TPA (2,4-fach), TPA + Cyclosporin A (2,3-fach) sowie dem Antikörper (3,0-fach) zu beobachten.

Auch auf RNA-Ebene sticht die Stimulation mit TPA + Dexamethason weit hervor. Allerdings muss betont werden, dass die in Tabelle 17 dargestellten absoluten Kopienzahlen nur eine eingeschränkte Aussage bieten, da die Effizienz der cDNA-Synthese (v.a. aufgrund unterschiedlicher RNA-Qualität) schwanken kann und somit

Tabelle 17 **Quantitative Analyse der Stimulation primärer PBMC mit 17 verschiedenen Substanzen bzw. Substanzkombinationen**

(a) Überstände

Stimulation	Konzentration	PLHV-1^c	PLHV-3^c	β-Aktin^d
unstimulierte Kontrolle	-	-	-	-
TPA	20ng/ml	78	-	-
n-Butyrat	3mM	-	-	-
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 3mM	267	-	-
Ionomycin	1μM	45	-	-
TPA + Ionomycin, gepulst ^a	20ng/ml + 0,5μM	-	-	-
Cyclosporin A	1μg/ml	3	-	-
TPA + Cyclosporin A	20ng/ml + 1μg/ml	-	-	-
Phytohämagglutinin	10μg/ml	7	-	-
TPA + Phytohämagglutinin	20ng/ml + 10μg/ml	-	-	-
Dexamethason	5μg/ml	-	-	-
TPA + Dexamethason	20ng/ml + 5μg/ml	153	2.696	372 (62)
Phytohämagglutinin + Dexamethason	10μg/ml + 5μg/ml	42	-	-
Lipopolysaccharide	5μg/ml	-	-	-
Pokeweed Mitogen	2,5μg/ml	-	-	-
Concanavalin A	2,5μg/ml	-	-	-
Tumor Nekrose Faktor (TNF α) ^b	10ng/ml	-	-	-
anti-Immunglobulin-Antikörper	Verdünnung 1:500	-	-	-

(b) Zellen

Stimulation	DNA		RNA							
	PLHV-1 ^f	PLHV-3 ^f	PLHV-1 ^g				PLHV-3 ^g			
			K	dT ^h	Hex ^h	Diff ^h	K	dT ^h	Hex ^h	Diff ^h
Nullkontrolle ^e	12.610	49.936	-	X	51	3,22	18	X	X	X
unstimulierte Kontrolle	8.928	21.269	-	7	434	4,21	5	X	794	4,71
TPA	21.292	39.197	-	15	339	6,58	4	X	288	8,34
n-Butyrat	5.813	25.751	-	X	22	5,41	4	X	X	X
TPA + n-Butyrat	5.383	28.347	6	X	X	X	69	X	X	X
Ionomycin	4.775	39.336	-	X	136	4,92	5	X	528	4,25
TPA + Ionomycin, gepulst ^a	6.378	30.528	-	56	406	4,68	-	43	418	6,12
Cyclosporin A	9.125	51.014	-	X	203	2,58	5	101	884	1,72
TPA + Cyclosporin A	20.389	51.990	3	X	1.089	3,05	11	X	838	4,92
Phytohämagglutinin	3.877	16.565	1	X	111	3,25	12	X	294	3,21
TPA + Phytohämagglutinin	4.182	30.283	-	9	98	5,13	4	63	399	4,40
Dexamethason	11.927	57.684	157	X	X	X	5	X	565	0,52
TPA + Dexamethason	126.556	160.324	3	67	4.655	0,34	10	613	5.670	1,41
Phytohämagglutinin + Dexamethason	4.544	25.583	-	X	257	4,46	16	X	556	4,72
Lipopolysaccharide	12.671	31.888	1	15	589	4,12	5	54	2.216	3,45
Pokeweed Mitogen	3.518	28.329	1	X	24	7,53	28	X	X	X
Concanavalin A	2.560	21.494	-	X	568	3,91	8	X	322	6,29
Tumor Nekrose Faktor (TNF α) ^b	7.014	25.971	2	24	943	3,22	12	X	1.790	3,63
anti-Immunglobulin-Antikörper	26.588	94.803	-	20	519	2,30	9	X	1.973	1,61

K = Kontrollansatz ohne Reverse Transkriptase in der cDNA-Synthese

dT = Oligo dT-Primern in der cDNA-Synthese

Hex = Random Hexamer-Primer in der cDNA-Synthese

Diff = C_t-Differenzwerte, berechnet aus den Werten von β -Aktin- und Virus-PCR (Virus-PCR [Hex] - β -Aktin-PCR [Hex])

- = Kopienzahl gleich null

X = nicht auswertbar (siehe ^h)^a die Zellen wurden zunächst mit TPA stimuliert; am nächsten Morgen wurde das Medium komplett durch frisches ersetzt, und diesem das Ionomycin zugefügt^b das TNF α wurde jeden Tag neu in der angegebenen Menge supplementiert^c angegeben sind Kopienzahlen pro ml (Mediane)^d angegeben sind Werte in pg; in Klammern aufgeführt sind die errechneten Zellzahlen (6pg DNA/Zelle)^e zum Zeitpunkt der Isolierung der PBMC genommene Zellprobe^f angegeben sind die auf eine Probe abgeglichenen Kopienzahlen (Mediane) in 50ng DNA (ca. 8.333 Zellen)^g Kopienzahlen in 25ng RNA^h Berücksichtigt werden nur Proben, deren C_t-Werte mindestens 3 Zyklen unter den C_t-Werten der jeweiligen Kontrollen liegen (rechnerisch: die achtfache Kopienzahl haben), um eine sichere Abgrenzung gegenüber einer eventuellen DNA-Kontamination zu gewährleisten

die Werte nicht unmittelbar miteinander vergleichbar sind. Um die Proben besser vergleichen zu können, wurde das stabil exprimierte β -Aktin in jeder cDNA-Probe bestimmt. Der dabei erhaltene C_t -Wert schwankt in gleichem Maße wie die Virus- C_t -Werte in Abhängigkeit von der Qualität der cDNA bzw. RNA. Subtrahiert man aber die beiden C_t -Werte (β -Aktin und Virus) voneinander, so gibt der ermittelte Differenzwert Auskunft über die Relation der beiden Transkripttypen zueinander. Ist die Transkription des untersuchten viralen Gens im Vergleich zu einer anderen Probe gesteigert oder vermindert, so wird sich dies in einem entsprechenden Unterschied der berechneten Differenzwerte widerspiegeln. Da die Ansätze, die mit den Random Hexamer-Primern gemacht wurden, eine bessere Auswertbarkeit zeigten (C_t -Werte fast immer auswertbar, da Differenz zur Kontrolle >3 Zyklen), wurden diese Proben zur Berechnung der Differenzwerte herangezogen. Die Virus- C_t -Werte lagen oberhalb der β -Aktin- C_t -Werte, so dass eine Zunahme der Virus-Transkripte im Vergleich zu den β -Aktin-Transkripten durch einen kleineren Differenzwert ausgedrückt wird. Die Daten in Tabelle 17 zeigen, dass sowohl bei PLHV-1 wie auch bei PLHV-3 die Stimulation mit TPA + Dexamethason am effizientesten war. Auch die Stimulation der Zellen mit Antikörper, Cyclosporin A und Dexamethason ergibt deutlich verringerte Differenzwerte. Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass einzelne Stimulationsprotokolle zu einer gesteigerten viralen Replikation führen.

Der Nachweis der DNA in den Kontrollreaktionen ist äußerst hinderlich bei der Beurteilung der Ergebnisse. Eine weitere Aufreinigung der RNA (DNase-Verdau) und erneute cDNA-Synthese war aber aufgrund geringer RNA-Ausbeuten bei der Extraktion nicht möglich; bei einigen Proben wurde fast die gesamte RNA für die erste cDNA-Reaktion verbraucht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Stimulation mit TPA + Dexamethason in den Zellen (DNA / RNA) am erfolgreichsten war. Auch eine Reihe anderer Stimulanzen bewirkte eine Aktivierung vor allem von PLHV-3, die jedoch deutlich geringer ausgeprägt war. Eine Freisetzung größerer Mengen potenziell entstandener Viruspartikel in die Überstände war nicht nachweisbar.

Um auszuschließen, dass der fehlende Nachweis von viraler DNA im Überstand auf eine zu kurze Kultivierungsdauer zurückzuführen ist, wurden PBMC in einem weiteren Versuch für die Dauer von sechs Tagen kultiviert. Es wurden an Tag 2 und

Tag 4 der Kultivierung ebenfalls Proben genommen, die Aufschluss über den Verlauf der Virusproduktion geben sollten. Da für jeden Versuch nur eine begrenzte Zellzahl zur Verfügung steht, wurden basierend auf den Ergebnissen des vorhergehenden Versuchs fünf Stimulationsarten ausgewählt, die ein positives Ergebnis erbracht hatten. Es waren dies die Stimulationen mit TPA, TPA + n-Butyrat, TPA + Dexamethason, Ionomycin sowie Phytohämagglutinin + Dexamethason. Mit diesen Stimulationsprotokollen konnte Virus im Überstand nachgewiesen bzw. auf Zellebene eindeutig ein Beginn der Replikation gezeigt werden. Für jedes Stimulationsprotokoll wurden drei parallele Kulturen von PBMC des Schweins 791 (PLHV-1- und -3-positiv, PLHV-2-negativ) angesetzt. Nach zwei, vier bzw. sechs Tagen wurde die Kultivierung beendet und Überstände sowie Zellen untersucht [s. Tab. 18]. Die Untersuchung der Überstände ergab keine eindeutigen Ergebnisse. Zwar konnte in einigen Proben Virus-DNA nachgewiesen werden, doch waren die Kopienzahlen auch hier sehr niedrig. Zudem war in fast allen viruspositiven Proben – insbesondere

Tabelle 18 Stimulation primärer PBMC mit ausgewählten Stimulationsprotokollen

(a) Überstände

Stimulation	Konzentration	d2			d4			d6		
		1 ^a	3 ^a	β-A ^b	1 ^a	3 ^a	β-A ^b	1 ^a	3 ^a	β-A ^b
unstimulierte Kontrolle	-	1	-	1 (<1)	-	-	-	6	18	-
TPA	20ng/ml	-	-	-	14	-	5 (<1)	263	937	322 (54)
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 3mM	-	-	-	249	2	6 (1)	1.031	1.206	524 (87)
TPA + Dexamethason	20ng/ml + 5µg/ml	30	259	35 (6)	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
Ionomycin	1µM	-	-	-	140	758	33 (6)	3.588	1.324	570 (95)
Phytohämagglutinin + Dexamethason	5µg/ml + 5µg/ml	10	43	26 (4)	-	-	-	574	71	1.663 (277)

(b) Zellen DNA

Stimulation	PLHV-1 ^d			PLHV-3 ^d		
	d2	d4	d6	d2	d4	d6
Nullkontrolle ^c	6.582			55.412		
unstimulierte Kontrolle	4.748	7.624	13.832	24.869	16.393	18.785
TPA	5.201	9.514	10.138	41.282	30.018	35.106
TPA + n-Butyrat	4.356	4.935	6.592	24.323	29.160	54.833
TPA + Dexamethason	13.995	117.167	n.u.	161.585	169.909	n.u.
Ionomycin	3.006	4.564	5.403	50.937	65.675	71.206
Phytohämagglutinin + Dexamethason	3.503	2.338	2.086	35.182	30.232	23.270

(c) Zellen RNA

Stimulation		PLHV-1 ^e				PLHV-3 ^e			
		K	dT ^f	Hex ^f	Diff ^f	K	dT ^f	Hex ^f	Diff ^f
Nullkontrolle ^c	d0	10	X	257	3,33	12	X	1.974	2,04
	d2	9	X	192	4,20	23	X	807	3,82
Unstimulierte Kontrolle	d4	0	18	154	5,57	6	X	696	5,08
	d6	7	19	289	4,81	6	X	587	5,57
TPA	d2	0	20	347	6,72	6	56	897	7,11
	d4	3	X	101	6,74	4	X	278	6,99
	d6	0	X	169	5,21	2	X	352	5,9
TPA + n-Butyrat	d2	17	X	55	4,94	40	X	934	2,38
	d4	23	X	X	X	47	X	420	4,27
	d6	11	X	X	X	34	X	260	4,87
TPA + Dexamethason	d2	5	41	543	3,67	11	1.868	9.354	1,18
	d4	20	163	3.242	0,94	7	614	3.531	2,75
	d6	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Ionomycin	d2	6	X	82	8,48	13	X	780	6,81
	d4	3	X	26	8,98	10	X	505	6,20
	d6	0	X	18	8,29	7	X	182	6,46
Phytohämagglutinin + Dexamethason	d2	7	X	91	6,07	27	X	554	5,10
	d4	0	X	97	7,23	0	X	232	7,68
	d6	0	7	127	6,20	0	X	221	7,16

1 = PLHV-1

3 = PLHV-3

 β -A = β -Aktin

d0 = Tag 0

d2 = Tag 2

d4 = Tag 4

d6 = Tag 6

n.u. = nicht untersucht

- = Kopienzahl gleich null

X = nicht auswertbar (siehe ^f)

K = Kontrollansatz ohne Reverse Transkriptase in der cDNA-Synthese

dT = Oligo dT-Primern in der cDNA-Synthese

Hex = Random Hexamer-Primer in der cDNA-Synthese

Diff = C_t-Differenzwerte, berechnet aus den Werten von β -Aktin- und Virus-PCR (Virus-PCR [Hex] - β -Aktin-PCR [Hex])^a angegeben sind Kopienzahlen pro ml (Mediane)^b angegeben sind Werte in pg; in Klammern aufgeführt sind die errechneten Zellzahlen (6pg DNA/Zelle)^c zum Zeitpunkt der Isolierung der PBMC genommene Zellprobe^d angegeben sind die auf eine Probe abgeglichenen Kopienzahlen (Mediane) in 50ng DNA (ca. 8.333 Zellen)^e Kopienzahlen in 25ng RNA^f Berücksichtigt werden nur Proben, deren C_t-Werte mindestens 3 Zyklen unter den C_t-Werten der jeweiligen Kontrollen liegen (rechnerisch: die achtfache Kopienzahl haben), um eine sichere Abgrenzung gegenüber einer eventuellen DNA-Kontamination zu gewährleisten

bei den für sechs Tage stimulierten Zellen – auch genomische DNA nachweisbar, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die nachgewiesene Virus-DNA nicht von Viruspartikeln, sondern aus zugrunde gegangenen Zellen stammt.

Auf DNA-Ebene erwies sich erneut die Stimulation mit TPA + Dexamethason als am wirkungsvollsten. Zwar war bei allen Stimulanzen (außer TPA + n-Butyrat, d2) eine

Steigerung der Kopienzahl von PLHV-3 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle festzustellen, doch blieb die 6,5-fache (d2) bzw. 10,4-fache (d4) Steigerung mit TPA + Dexamethason unerreicht. Auch die mit Ionomycin (d2 2,0-fach; d4 4,0-fach; d6 3,8-fach) und TPA + n-Butyrat (d6 2,9-fach) behandelten Zellen zeigten eine gesteigerte Kopienzahl. Für PLHV-1 war TPA + Dexamethason sogar das einzige Stimulationsprotokoll, das eine deutliche Steigerung der Kopienzahl bewirkte (d2: 2,9-fach; d4: 15,4-fach); nur die Stimulation mit TPA allein vermochte noch eine sehr leichte Zunahme der Kopienzahl zu bewirken (d2: 1,1-fach; d4: 1,2-fach).

Bei der Untersuchung der viralen RNA war in diesem Versuch sowohl bei PLHV-1 wie auch bei PLHV-3 ein deutlicher Effekt nur bei Stimulation mit TPA + Dexamethason zu vermerken; Kopienzahl wie auch C_T -Differenzwerte deuten auf eine beginnende Transkription der Viren hin. Interessant dabei ist, dass die Transkription von PLHV-1 erst am Tag 4 (oder 3) zu beginnen scheint, während die von PLHV-3 am Tag 2 wesentlich stärker ist und an Tag 4 bereits wieder nachlässt. Die für sechs Tage mit TPA + Dexamethason stimulierte Kultur war nicht auszuwerten, so dass hierfür nur die Daten bis Tag 4 vorliegen. Für PLHV-3 war auch bei der Stimulation mit TPA + n-Butyrat ein leichter Effekt zu vermerken, der jedoch deutlich geringer war als bei TPA + Dexamethason.

Auch in diesem Versuchsansatz konnte für PLHV-3 ein deutlicher Effekt bei Stimulation mit TPA + Dexamethason beobachtet werden, während andere Stimulanzen eine deutlich geringere (PLHV-3) oder annähernd keine (PLHV-1) Wirkung zeigten. Trotz der verlängerten Kultivierungsdauer sind auch hier nur geringe Mengen an Virus in den Überständen nachweisbar, weshalb wiederum lediglich die Kopienzahlen der Virusgenome (und Transkripte) in den Zellen als Kriterium für die virale Replikation herangezogen werden können. Betrachtet man diese Werte, so fällt auf, dass die Zunahme der Genome bei den wirksamen Stimulanzen an Tag 4 in den meisten Fällen deutlicher ausgeprägt ist als an Tag 2, so dass in zukünftigen Experimenten über mindestens diesen Zeitraum stimuliert werden sollte. Zumindest bei einzelnen Stimulanzen war aber eine weitere Steigerung der Kopienzahl bis Tag 6 zu beobachten; eine Kultivierung über diesen Zeitraum erschien also für zukünftige Experimente sinnvoll.

3.2.4.3 Nachweis der PLH-Viren in verschiedenen Populationen der mononukleären Blutzellen

Da durch die Stimulation von primären PBMC – wenn überhaupt – nur sehr geringe Mengen an Viruspartikeln in den Überständen nachweisbar waren, wurde nach Alternativen zu diesem Versuchsansatz gesucht. Eine Möglichkeit hätte in der alleinigen Kultivierung und Stimulation von virustragenden PBMC-Subpopulationen bestanden, wodurch eventuell immunologische Effekte der primären PBMC – einer Mischkultur verschiedener Zelltypen – hätten vermieden werden können und somit vielleicht eine effizientere Virusreplikation möglich geworden wäre. Erfolg versprechender erschien die Stimulation einer persistent mit PLHV infizierten porcinen lymphoblastoiden Zelllinie, da durch dieses Verfahren bei EBV und HHV-8 recht gute Erfolge erzielt werden können [63-65]. Allerdings stand bis dahin keine PLHV-infizierte Zelllinie zur Verfügung, da ein Auswachsen virustragender primärer Zellen, vergleichbar dem EBV-transformierter B-Zellen, in den bisherigen Versuchen nicht zu beobachten war. Es sollte deshalb in etablierten porcinen lymphoblastoiden Zelllinien, an deren Transformation Herpesviren beteiligt sein können, nach den PLH-Viren gesucht werden. Im Falle eines negativen Ergebnisses sollte versucht werden, die Zellen durch Kokultivierung mit PCR-positiven primären Zellen zu infizieren. Zur Auswahl von Zelllinien, bei denen eine Infektion mit einem der PLH-Viren überhaupt möglich ist, war es jedoch erforderlich, Erkenntnisse über den Tropismus dieser Viren zu erlangen. Es wurden deshalb zunächst Experimente zur Bestimmung der virustragenden PBMC-Subpopulation(en) durchgeführt.

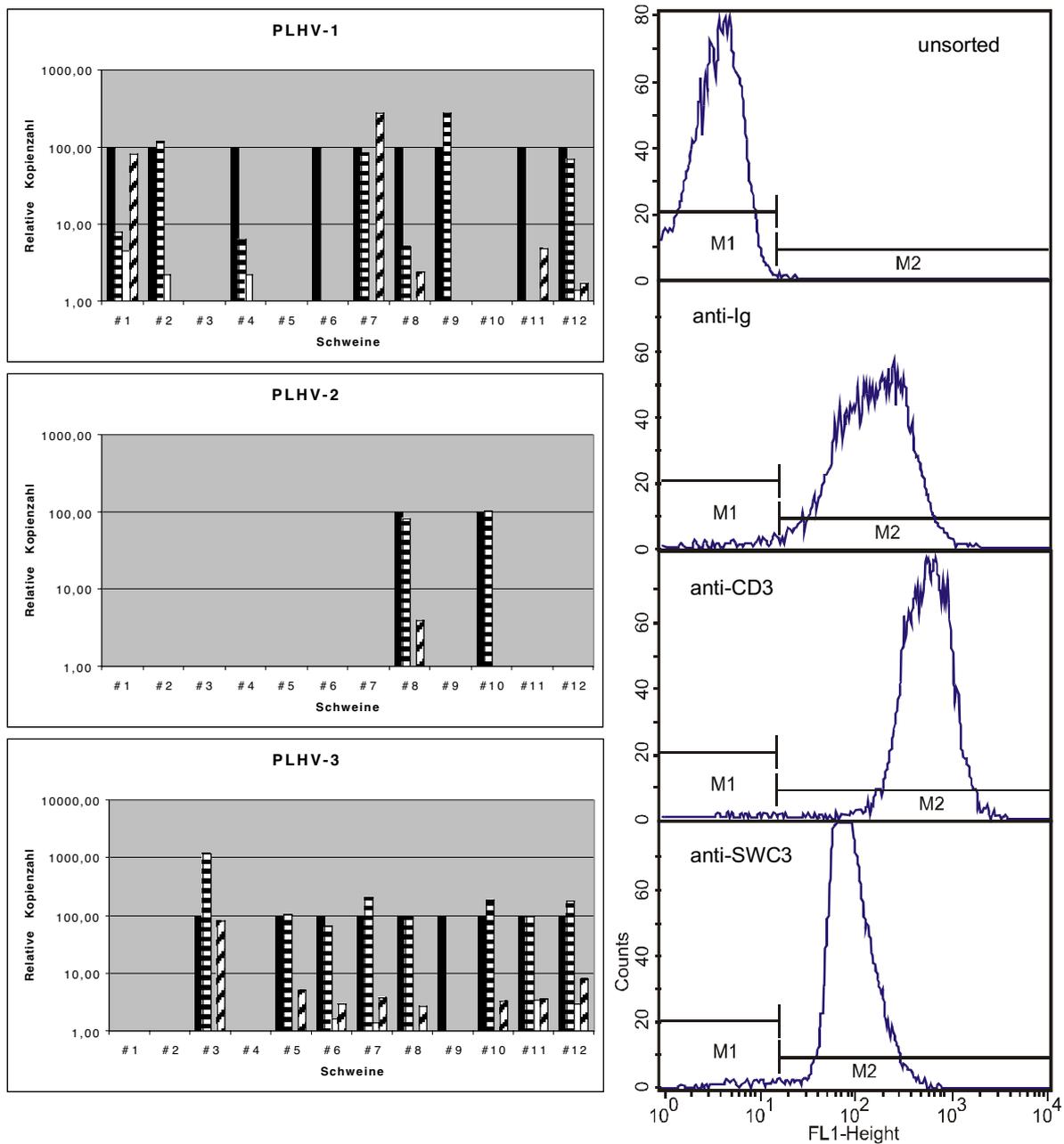
Diese Untersuchungen sollten auf die drei Hauptpopulationen der PBMC (B-Zellen, T-Zellen, myeloide Zellen) beschränkt werden. Dafür wurden aus frisch isolierten PBMC eines Schweins jeweils die drei Subpopulationen mittels Magnetic Beads angereichert und ihre Reinheit durchflusszytometrisch kontrolliert. Im Anschluss wurde die DNA extrahiert und per quantitativer PCR untersucht.

Auf diese Art wurde mit den Blutzellen von insgesamt zwölf Schweinen verfahren. Bei diesen zwölf Schweinen lag die Reinheit aller PBMC-Subpopulationen bei mindestens 95%. In Abbildung 14 sind die in den einzelnen Populationen bestimmten Kopienzahlen als relative Werte dargestellt, da die absoluten Zahlen in einer großen Bandbreite schwanken. Es wurden deshalb in Tabelle 19 (S. 94) die absoluten Kopienzahlen in den Subpopulationen der einzelnen Schweine ebenfalls aufgeführt.

Der Abbildung 14 wurde des Weiteren exemplarisch ein Ergebnis der durchflusszytometrischen Kontrolle der sortierten Populationen zugefügt.

Von den untersuchten zwölf Schweinen erwiesen sich neun als positiv für PLHV-1, zwei für PLHV-2 und ebenfalls neun für PLHV-3. Sechs waren doppelt positiv (fünfmal PLHV-1 + PLHV-3; einmal PLHV-2 + PLHV-3), und ein Schwein war sogar mit allen drei Viren infiziert.

Abbildung 14 Relative Virus-Kopienzahlen in den sortierten PBMC-Subpopulationen



Links sind die relativen Kopienzahlen der sortierten PBMC-Subpopulationen von zwölf Schweinen dargestellt. Auf die Darstellung der absoluten Zahlen wurde verzichtet, da diese bei den einzelnen Schweinen stark variierten (s.Tab. 19).

■ Unsortierte PBMC □ Ig⁺ ▨ CD3⁺ ▩ SWC3⁺

Rechts ist ein Beispiel für die durchflusszytometrische Kontrolle der Populationen dargestellt (Schwein #9)

Für PLHV-1 lagen die in der unsortierten Kontrolle gefundenen Kopienzahlen bei fast allen neun Schweinen verhältnismäßig niedrig (Ausnahme: Tier 8). Dies erschwerte die Auswertung und Interpretation der Daten, da die Schwankungsbreite der PCR im Bereich der niedrigen Kopienzahlen verhältnismäßig groß ist. Bei einem Schwein mit sehr niedriger Kopienzahl in den unsortierten PBMC (Tier 6) verlor sich das Signal in den sortierten Populationen völlig. Fünf Schweine zeigten das stärkste Signal in den B-Zellen (Tiere 2, 4, 8, 9, 12), drei in den myeloiden Zellen (Tiere 1, 7, 11). Nur bei drei der neun Schweine (Tiere 2, 7, 9) war die Kopienzahl in einer sortierten Population größer als in der nicht sortierten Kontrolle (2x B-Zellen, 1x myeloide Zellen). In der T-Zell-Population konnte bei fünf Schweinen (Tiere 1, 2, 4, 8, 12) Virus nachgewiesen werden; die erhaltenen Kopienzahlen erwiesen sich jedoch in allen Fällen als verhältnismäßig niedrig.

Beide mit PLHV-2 infizierten Schweine (Tiere 8, 10) zeigten ein starkes Signal in den B-Zellen; bei Tier 8 war darüber hinaus auch in den myeloiden Zellen Virus detektierbar. Die T-Zellen waren in beiden Fällen negativ.

Unter den neun PLHV-3-positiven Schweinen hatte ebenfalls eines eine sehr geringe Kopienzahl (Tier 9), bei dem das Signal in den sortierten Populationen verloren ging. Bei den acht übrigen Schweinen (Tiere 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12) war die Viruslast in den B-Zellen am höchsten. Bei allen acht Schweinen war darüber hinaus auch Virus in den myeloiden Zellen nachweisbar, aber nur bei fünf Schweinen (Tiere 6, 7, 8, 11, 12) verlief die Untersuchung der T-Zellen positiv. Die Kopienzahlen lagen dabei im

Tabelle 19 Absolute Virus-Kopienzahlen in den sortierten PBMC-Subpopulationen

Schwein	Population	Reinheit ^a	PLHV-1 ^b	PLHV-2 ^b	PLHV-3 ^b
1	unsortiert		122	-	-
	Ig ⁺	95,2	10	-	-
	CD3 ⁺	99,8	6	-	-
	SWC3 ⁺	97,3	99	-	-
2	unsortiert		733	-	-
	Ig ⁺	99,2	861	-	-
	CD3 ⁺	99,8	17	-	-
	SWC3 ⁺	99,3	6	-	-
3	unsortiert		-	-	49
	Ig ⁺	96,7	-	-	572
	CD3 ⁺	99,8	-	-	-
	SWC3 ⁺	98,7	-	-	39

Schwein	Population	Reinheit ^a	PLHV-1 ^b	PLHV-2 ^b	PLHV-3 ^b
4	unsortiert		424	-	-
	Ig ⁺	97,5	27	-	-
	CD3 ⁺	99,7	10	-	-
	SWC3 ⁺	98,5	3	-	-
5	unsortiert		-	-	811
	Ig ⁺	97,2	-	-	818
	CD3 ⁺	99,7	-	-	-
	SWC3 ⁺	97,8	-	-	42
6	unsortiert		3	-	21.119
	Ig ⁺	99,3	-	-	13.929
	CD3 ⁺	99,5	-	-	349
	SWC3 ⁺	98,4	-	-	618
7	unsortiert		3	-	67.223
	Ig ⁺	98,5	2	-	137.838
	CD3 ⁺	99,8	-	-	943
	SWC3 ⁺	98,2	8	-	2.614
8	unsortiert		2.321	342	3.138
	Ig ⁺	97,5	122	280	2.882
	CD3 ⁺	99,8	11	-	24
	SWC3 ⁺	97,8	56	14	85
9	unsortiert		6	-	1
	Ig ⁺	99,1	16	-	-
	CD3 ⁺	99,8	-	-	-
	SWC3 ⁺	99,1	-	-	-
10	unsortiert		-	151	1.830
	Ig ⁺	97,6	-	152	3.461
	CD3 ⁺	99,7	-	-	-
	SWC3 ⁺	97,8	-	-	59
11	unsortiert		57	-	4.070
	Ig ⁺	96,2	-	-	3.980
	CD3 ⁺	98,9	-	-	143
	SWC3 ⁺	97,9	3	-	148
12	unsortiert		150	-	2.814
	Ig ⁺	97,0	105	-	5.096
	CD3 ⁺	99,5	2	-	85
	SWC3 ⁺	98,6	3	-	230

^a prozentuale Werte, durchflusszytometrisch ermittelt

^b angegeben sind die auf eine Probe abgeglichenen Kopienzahlen (Mediane) in 50ng DNA (ca. 8.333 Zellen)

Vergleich zu den stark viruspositiven unsortierten PBMC (und auch B-Zellen) verhältnismäßig niedrig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass von den hier untersuchten Zellpopulationen vor allem die B-Zellen die PLH-Viren tragen. Auch in den myeloiden Zellen war gelegentlich eine hohe Viruslast zu erkennen, während in den T-Zellen – wenn überhaupt – nur geringe Kopienzahlen nachweisbar waren. Auffallend war weiterhin, dass nur in der Minderzahl der Fälle die Zahl der Viruskopien in einer der sortierten Populationen im Vergleich zur unsortierten Kontrolle stark oder zumindest deutlich zunahm (PLHV-1: Tiere 7, 9; PLHV-3: Tiere 3, 7, 10, 12), obwohl dies grundsätzlich zu erwarten gewesen wäre. Die Anreicherung einer infizierten Zellpopulation müsste theoretisch bei Einsatz einer äquivalenten Menge DNA in der PCR eine deutliche Erhöhung der in dieser Population nachgewiesenen Kopienzahl im Vergleich zur unsortierten Kontrolle bewirken. In der Mehrzahl der Fälle blieb die Kopienzahl aber in der höchstbeladenen Population im Verhältnis zur Kontrolle in etwa gleich oder sank sogar leicht ab.

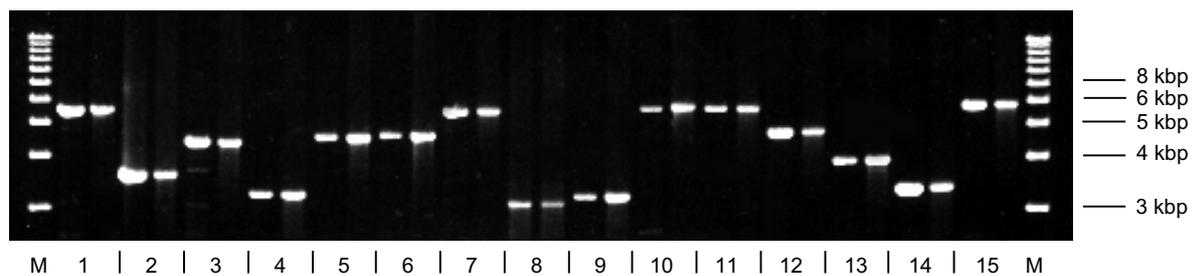
Von einer Zellbank (ECACC) wurde die porcine B-Zelllinie L23 erworben, die sich als stark positiv für PLHV-3 (P-905s/as) erwies. In einer Analyse mittels TaqMan-PCR ließen sich pro Zelle bis zu 420 Kopien nachweisen. Diese Werte schwankten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme.

Für alle weiteren Stimulationsversuche sollte nun diese Zelllinie verwendet werden; zuvor musste allerdings das in den Zellen befindliche Virusgenom charakterisiert und – soweit möglich – auf eventuelle Fehler wie Deletionen oder Insertionen hin untersucht werden. Auf eine Stimulation primärer Zellen wurde im Weiteren verzichtet.

3.2.4.4 Porcine B-Zelllinie L23

3.2.4.4.1 Untersuchung des viralen Genoms in den L23-Zellen auf Deletionen oder Insertionen

Um auszuschließen, dass das Virus im Laufe der Kultivierung der Zellen einen Teil seines Genoms verloren oder Insertionen erhalten hat, wurde eine Reihe von Long Distance-PCRs durchgeführt, die den bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Teil des Genoms (ca. 62 kbp) umfassten. Zusätzlich zu den bereits in dieser Arbeit vorgestellten 25 kbp des Genoms von PLHV-3 waren weitere ca. 37 kbp von mehreren Mitgliedern der Arbeitsgruppe P24 am Robert Koch-Institut (B. Ehlers, C. Schadow,

Abbildung 15 Vergleich der Genomlänge von PLHV-3 in L23-Zellen und der Probe #489

15 Primerpaare wurden zur Erzeugung von überlappenden Amplifikaten von PLHV-3 (3 bis 6 kbp) verwendet. Sie überspannen die Region von 5' von ORF 03 bis ORF 49. Die Amplifikate aus der L23-Probe sowie Probe #489 sind jeweils nebeneinander auf ein 0,75%iges Agarosegel aufgetragen. Eine 1 kbp DNA Leiter dient als Marker.

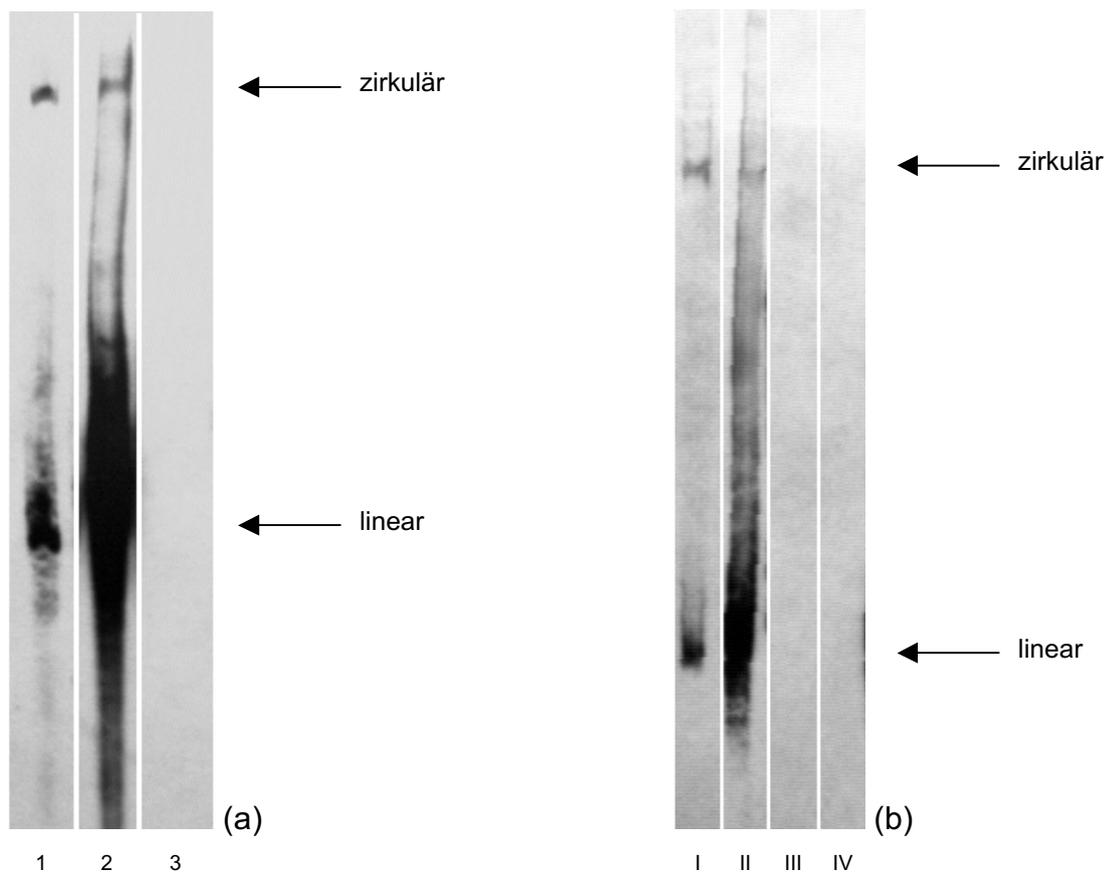
S. Brema, C. Bauer, S. Noack) sequenziert worden. Dadurch konnte der Genomabschnitt zwischen dem nicht-kodierenden Bereich 5' von ORF 03 bis zum ORF 49 auf Längenveränderungen kontrolliert werden. Um eine lückenlose Überprüfung des Genoms zu ermöglichen, wurden die Primer so gewählt, dass die PCR-Produkte sich überlappten. Zudem sollten sie ein Amplifikat von maximal 6 kbp erzeugen, um nach einer Gelelektrophorese eine Beurteilung ihrer Größe bzw. einen direkten Größenvergleich zu erlauben. Dafür wurden dieselben Primerpaarungen bei der PLHV-3-positiven Probe #489 angewendet, anhand derer die Sequenzdaten gewonnen worden waren; sie wurde zum ‚Referenzstamm‘ bestimmt. In Abbildung 15 sind die Amplifikate aus der Zelllinie L23 sowie der Probe #489 jeweils direkt nebeneinander aufgetragen. Alle Amplifikate haben die erwartete Größe; Größenunterschiede zwischen den beiden Proben sind nicht erkennbar. Es kann also davon ausgegangen werden, dass – zumindest in diesem Teil des Genoms – keine größeren Deletionen oder Insertionen vorliegen.

3.2.4.4.2 Nachweis von linearem Virusgenom in L23-Zellen

Um zu überprüfen, ob PLHV-3 in den L23-Zellen latent vorliegt oder das Virus auch repliziert, wurde eine Gardella-Gel-Analyse durchgeführt. Diese Methode wurde mit Hilfe der EBV-tragenden Zelllinie B95-8 etabliert. In einem Teil dieser Zellen befindet sich das Virus immer in der produktiven Phase der Infektion [25], so dass in einer Gardella-Gel-Analyse immer sowohl zirkuläres als auch lineares Genom nachweisbar ist [s. Abb. 16 (a)]. In einigen Versuchen mit den L23-Zellen diente sie darüber hinaus als Positivkontrolle.

Bei der Analyse der L23-Zellen konnten ebenfalls zwei Banden im Gel dargestellt werden. Diese Banden lagen in vergleichbarer Höhe zu den EBV-Banden der B95-8-

Abbildung 16 Gardella-Gel-Analyse von B95-8- und L23-Zellen



(a) Etablierung der Gardella-Gel-Analyse mit B95-8-Zellen

Spur 1: 1×10^6 B95-8-Zellen; Spur 2: 1×10^6 B95-8-Zellen, 2 Tage mit TPA stimuliert; Spur 3: 5×10^6 Molt 4/8-Zellen

(b) Analyse der L23-Zellen

Spur I: 3×10^6 L23-Zellen; Spur II: 1×10^6 B95-8-Zellen; Spur III: 5×10^6 L52-Zellen; Spur IV: 5×10^6 Molt 4/8-Zellen

Die Spuren in den Abbildungsteilen (a) und (b) stammen von jeweils demselben Gel

Zellen, wodurch sie als die zwei Konformationen des PLHV-3-Genoms identifiziert werden konnten [s. Abb. 16 (b)]. Als Kontrollzellen dienten dabei die Herpesvirus-freien Molt 4/8-Zellen (humane $CD4^+$ lymphoblastoide Zellen) sowie die porcine B-Zelllinie L52, die zwar PLHV-3 trägt, dies jedoch in einer etwa um den Faktor 1.000 niedrigeren Kopienzahl als die L23-Zellen (unveröffentlichte Daten von B. Ehlers). Diese Zellen wurden trotz der Präsenz von PLHV-3 als Kontrollzellen verwendet, da sie unter den hier angewendeten Bedingungen kein virusspezifisches Signal zeigten und so die Herkunft des bei Untersuchung der L23-Zellen erhaltenen Signals aus dem porcinen Genom ausgeschlossen werden konnte. Zwar konnte lineares Genom in den L23-Zellen nachgewiesen werden, doch ist die Signalstärke im Vergleich zu den EBV-Signalen nur schwach ausgeprägt; es konnte deshalb nicht immer nachgewiesen werden.

3.2.4.4.3 Stimulationsversuche mit L23-Zellen

In einem ersten Versuch wurde die Auswahl von Stimulanzen verwendet, die erfolgreich bei primären PBMC eingesetzt wurden. Zusätzlich wurden anti-Immunglobulin-Antikörper eingesetzt, die für die Stimulation der B-Zelllinie als Erfolg versprechend angesehen wurden. Bei EBV-infizierten B-Zelllinien führt die Quervernetzung von Ig-Molekülen auf der Zelloberfläche zu einer effizienten Reaktivierung der Viren in den latent infizierten Zellen [65]. Auch bei Stimulation primärer Blutzellen wiesen die Ergebnisse auf eine Reaktivierung der Viren hin. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von vier Tagen kultiviert und sowohl die Überstände wie auch die Zellen

Tabelle 20 Stimulation der L23-Zellen

(a) Überstände

<u>Stimulation</u>	<u>Konzentration</u>	<u>PLHV-3^a</u>	<u>β-Aktin^b</u>
unstimulierte Kontrolle	-	-	-
TPA	20ng/ml	62	-
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 3mM	-	-
TPA + Dexamethason	20ng/ml + 5µg/ml	-	-
Ionomycin	1µM	164	-
anti-Immunglobulin-Antikörper	Verdünnung 1:500	58	-

(b) Zellen

<u>Stimulation</u>	<u>DNA^d</u>	<u>RNA^e</u>			
		<u>K</u>	<u>dT^f</u>	<u>Hex^f</u>	<u>Diff^f</u>
Nullkontrolle ^c	78.476	24	82.823	529.365	-2,38
unstimulierte Kontrolle	70.679	55	54.592	384.938	-2,23
TPA	74.703	92	86.602	468.872	-3,66
TPA + n-Butyrat	45.117	77	25.839	101.904	-1,62
TPA + Dexamethason	81.313	15	40.535	296.562	-2,54
Ionomycin	77.400	40	92.145	528.127	-3,81
anti-Immunglobulin-Antikörper	67.546	191	14.363	62.628	-1,9

K = Kontrollansatz ohne Reverse Transkriptase in der cDNA-Synthese

dT = Oligo dT-Primern in der cDNA-Synthese

Hex = Random Hexamer-Primer in der cDNA-Synthese

- = Kopienzahl gleich null

Diff = C_T-Differenzwerte, berechnet aus den Werten von β-Aktin- und Virus-PCR (Virus-PCR [Hex] - β-Aktin-PCR [Hex])

^a angegeben sind Kopienzahlen pro ml (Mediane)

^b angegeben sind Werte in pg; in Klammern aufgeführt sind die errechneten Zellzahlen (6pg/Zelle)

^c zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns genommene Zellprobe

^d angegeben sind die auf eine Probe abgeglichenen Kopienzahlen (Mediane) in 1ng DNA (ca. 167 Zellen)

^e Kopienzahlen in 50ng RNA

^f Berücksichtigt werden nur Proben, deren C_T-Werte mindestens 3 Zyklen unter den C_T-Werten der jeweiligen Kontrollen liegen (rechnerisch: die achtfache Kopienzahl haben), um eine sichere Abgrenzung gegenüber einer eventuellen DNA-Kontamination zu gewährleisten

(DNA + RNA) mit der quantitativen PCR untersucht [s. Tab. 20]. Zwar konnte bei Stimulation der Zellen mit TPA, Ionomycin oder dem Antikörper in den Überständen Virus nachgewiesen werden, jedoch nur in sehr niedriger Kopienzahl. In den Zellen war die ohnehin schon sehr hohe Kopienzahl der Viren (ca. 420 Kopien pro Zelle) durch eine Stimulation nicht wesentlich zu steigern. Die Zahl der Transkripte schien bei Stimulation der Zellen tendenziell eher abzunehmen. Davon ausgenommen sind zwei der Stimulanzen, bei denen Virus im Überstand nachzuweisen war (TPA, Ionomycin) sowie TPA + Dexamethason. Hier war eine leichte Steigerung der Transkriptzahlen bzw. eine Verschiebung des Differenzwertes zugunsten der viralen Transkripte zu beobachten.

Da in diesem Versuch nicht gezeigt werden konnte, dass eine Stimulation eine zusätzliche Steigerung der scheinbar in den Zellen ohnehin vonstatten gehenden Replikation ermöglicht, sollte untersucht werden, ob zu einem früheren Zeitpunkt (Tag 1) nach Stimulation ein Effekt festzustellen ist. Es sollte so eine bessere Aussage über den Beginn bzw. eine Steigerung der Transkription des gB-Gens möglich werden. Die Stimulanzen wurden in den gleichen Konzentrationen wie in dem ersten Versuch eingesetzt [s. Tab. 21].

Tabelle 21 Zeitkinetik der Stimulation von L23-Zellen

(a) Überstände

<u>Stimulation</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Tag</u>	<u>PLHV-3^a</u>	<u>β-Aktin^b</u>
unstimulierte Kontrolle	-	d1	-	-
		d4	8	-
TPA	20ng/ml	d1	614	-
		d4	537	-
TPA + n-Butyrat	20ng/ml + 3mM	d1	7	-
		d4	-	-
TPA + Dexamethason	20ng/ml + 5µg/ml	d1	1	-
		d4	284	-
Ionomycin	1µM	d1	3.546	5 (<1)
		d4	2.317	4 (<1)
anti-Immunglobulin-Antikörper	Verdünnung 1:500	d1	380	-
		d4	-	-

(b) Zellen

Stimulation		DNA ^d	RNA ^e			
			K	dT ^f	Hex ^f	Diff ^f
Nullkontrolle ^c	d0	65.989	150	23.775	185.064	-7,00
unstimulierte Kontrolle	d1	73.123	56	44.910	290.137	-5,28
	d4	49.273	18	21.321	133.793	-5,72
TPA	d1	55.228	16	35.541	308.663	-7,16
	d4	90.410	18	18.726	137.876	-6,51
TPA + n-Butyrat	d1	79.272	22	87.245	549.278	-6,45
	d4	55.301	15	9.812	98.806	-6,09
TPA + Dexamethason	d1	71.475	124	83.478	530.638	-6,59
	d4	53.397	80	20.415	198.486	-4,54
Ionomycin	d1	71.147	70	49.301	426.951	-5,11
	d4	114.872	63	45.402	305.567	-7,50
anti-Immunglobulin-Antikörper	d1	48.640	719	30.674	472.322	-6,25
	d4	41.818	34	68.838	365.907	-7,52

d0 = Tag 0

d1 = Tag 1

d4 = Tag 4

K = Kontrollansatz ohne Reverse Transkriptase in der cDNA-Synthese

dT = Oligo dT-Primern in der cDNA-Synthese

Hex = Random Hexamer-Primer in der cDNA-Synthese

Diff = C_t-Differenzwerte, berechnet aus den Werten von β-Aktin- und Virus-PCR (Virus-PCR [Hex] - β-Aktin-PCR [Hex])

- = Kopienzahl gleich null

X = nicht auswertbar (siehe ^f)^a angegeben sind Kopienzahlen pro ml (Mediane)^b angegeben sind Werte in pg; in Klammern aufgeführt sind die errechneten Zellzahlen (6pg DNA/Zelle)^c zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns genommene Zellprobe^d angegeben sind die auf eine Probe abgeglichenen Kopienzahlen (Mediane) in 1ng DNA (ca. 167 Zellen)^e Kopienzahlen in 50ng RNA^f Berücksichtigt werden nur Proben, deren C_t-Werte mindestens 3 Zyklen unter den C_t-Werten der jeweiligen Kontrollen liegen (rechnerisch: die achtfache Kopienzahl haben), um eine sichere Abgrenzung gegenüber einer eventuellen DNA-Kontamination zu gewährleisten

Auch in dieser Zeitkinetik ist Virus-DNA in den Überständen nachweisbar; bei den mit Ionomycin stimulierten Zellen bleibt jedoch ein Zweifel über die Herkunft der Virusgenome, da in Spuren auch genomische DNA nachweisbar ist. Abgesehen von der nur eingeschränkt bewertbaren Ionomycin-Probe hat TPA das beste Resultat erzielt, wenn auch wiederum die nachgewiesenen Kopienzahlen sehr niedrig blieben.

In den Zellen ist auf DNA-Ebene zu beobachten, dass die Kopienzahlen am Tag 1 bei Stimulation mit TPA oder Antikörper im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle geringer, in den sonstigen Proben aber annähernd unverändert sind. Am Tag 4 ist sie deutlich erhöht bei TPA (1,8-fach) und Ionomycin (2,3-fach), während sie bei

TPA + n-Butyrat und TPA + Dexamethason nur wenig ansteigt. In den mit dem Antikörper stimulierten Zellen ist die Kopienzahl gesunken.

Da die RNA-Isolation und cDNA-Synthese der an Tag 4 genommenen Proben deutlich ungünstiger verlaufen ist (wie die β -Aktin-PCR-Daten zeigen; hier nicht dargestellt), sollten die Transkriptzahlen nur untereinander und nicht mit den Zahlen von Tag 1 direkt verglichen werden. Betrachtet man nur die Differenzwerte, so ist zu erkennen, dass die Stimulation der Zellen mit TPA, TPA + n-Butyrat, TPA + Dexamethason sowie dem Antikörper eine leicht verstärkte Transkription von gB an Tag 1 bewirkt. An Tag 4 ist diese bei den mit TPA + Dexamethason stimulierten Zellen im Gegensatz zu den anderen drei Stimulationsprotokollen nicht mehr nachweisbar; dafür erscheint die Zahl der Transkripte bei Stimulation mit Ionomycin leicht erhöht.

In den beiden beschriebenen Versuchen wird deutlich, dass durch eine Behandlung der L23-Zellen mit den hier verwendeten Substanzen und Konzentrationen keine eindeutige Steigerung der Virusproduktion in den Zellen nachweisbar ist; lediglich bei Stimulation mit TPA oder Ionomycin ist ein leichter Effekt auf DNA-Ebene erkennbar (Steigerung bis zu 1,8- bzw. 2,3-fach). Auch in den Überständen sind keine nennenswerten Mengen an DNase-resistentem Virusgenom vorhanden.

Für andere Herpesviren wie z.B. HHV-8 konnte bereits gezeigt werden, dass eine Variation der eingesetzten Substanz-Konzentrationen einen deutlichen Effekt auf die Effizienz der Virusreplikation haben kann [63]. Es wurden deshalb Versuche durchgeführt, in denen die Chemikalienkonzentrationen variiert wurden.

Die vier Chemikalien (-kombinationen), die in den vorhergehenden Versuchen einen (geringgradig) positiven Effekt auf die Virusreplikation hatten, wurden in verschiedenen Konzentrationen den L23-Zellen zugesetzt. Um einen eventuellen Effekt zu verifizieren, wurden diese Versuche jeweils zweimal durchgeführt. Nach sechs Tagen wurde die Kultivierung beendet; analysiert wurden anschließend lediglich die Überstände.

Aus den in Tabelle 22 dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass auch durch eine Stimulation der L23-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Stimulanzen keine größeren Mengen von Viruspartikeln im Überstand nachweisbar werden. Zwar konnte in einzelnen Proben Virus-DNA, die aus Kapsiden stammen könnte, detektiert werden, doch ist keines der Stimulanzen in der Lage, dies in größeren Mengen und reproduzierbar zu bewirken.

Tabelle 22 Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation

TPA	Versuch #3		Versuch #4	
	PLHV-3 ^a	β-Aktin ^b	PLHV-3 ^a	β-Aktin ^b
unstimuliert	738	-	1.191	-
20ng/ml	11.243	6 (1)	-	-
50ng/ml	7.718	2 (<1)	-	-
100ng/ml	107	-	-	-
200ng/ml	28.375	24 (4)	1.732	-
500ng/ml	21.116	20 (3)	8.619	4 (1)

TPA + Dexamethason	Versuch #3		Versuch #4	
	PLHV-3 ^a	β-Aktin ^b	PLHV-3 ^a	β-Aktin ^b
unstimuliert	198	1 (<1)	-	-
20ng/ml + 0,1µg/ml	-	-	-	-
20ng/ml + 0,5µg/ml	1	-	-	-
20ng/ml + 1µg/ml	-	-	324	2 (<1)
20ng/ml + 5µg/ml	6	-	3	-
20ng/ml + 10µg/ml	-	-	-	-

Ionomycin	Versuch #3		Versuch #4	
	PLHV-3 ^a	β-Aktin ^b	PLHV-3 ^a	β-Aktin ^b
unstimuliert	-	-	1.463	-
0,2µM	3.580	1 (<1)	4.656	-
0,5µM	1.624	-	-	-
1µM	430	-	-	-
1,5µM	3	-	2.518	4 (<1)
2µM	2.322	2 (<1)	21	-

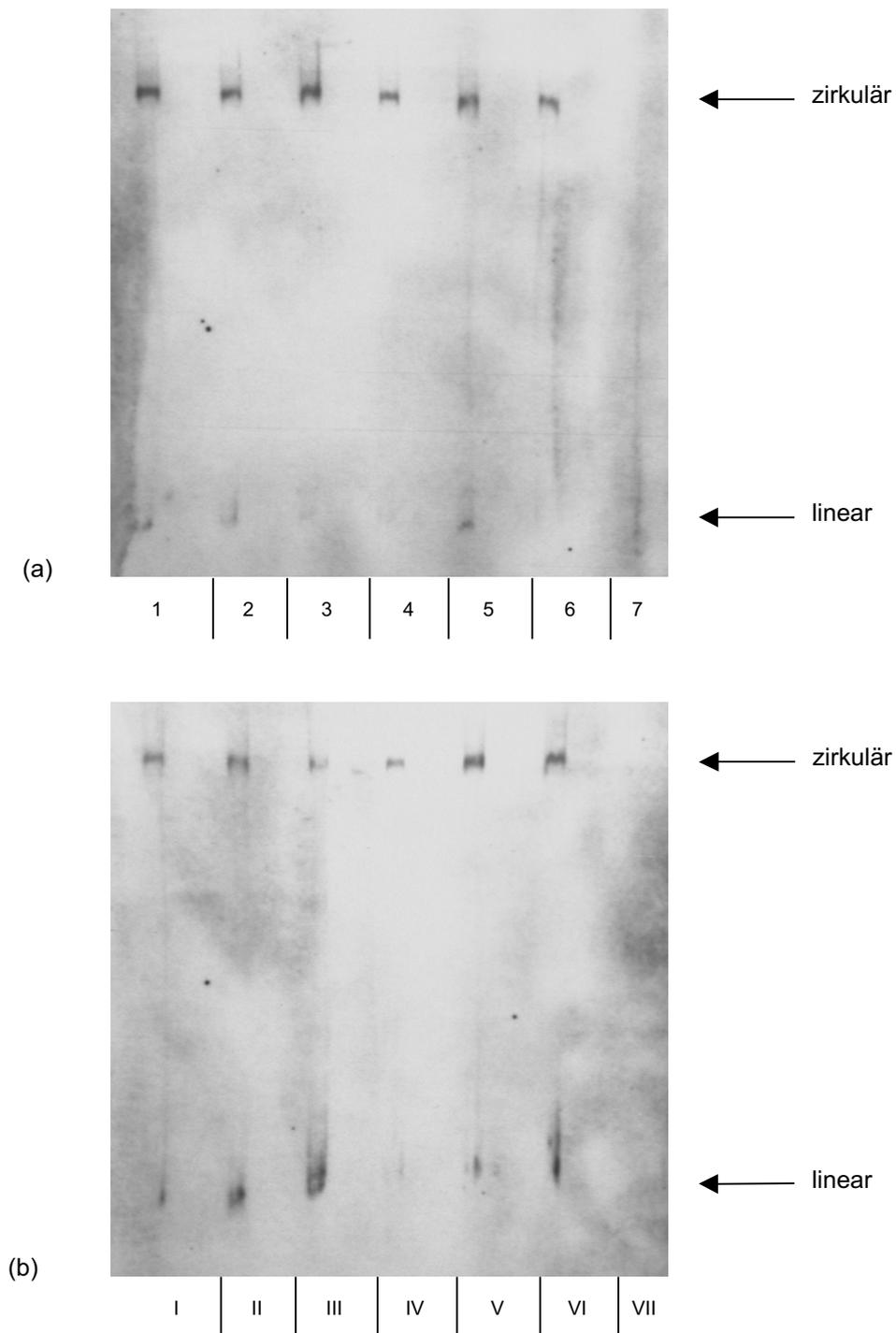
anti-Ig-Antikörper	Versuch #3		Versuch #4	
	PLHV-3 ^a	β-Aktin ^b	PLHV-3 ^a	β-Aktin ^b
unstimuliert	538	-	2.872	1 (<1)
Verdünnung 1:200	-	-	-	-
Verdünnung 1:500	-	-	2.620	-
Verdünnung 1:1.000	2.665	-	-	-
Verdünnung 1:2.000	-	-	2.054	-
Verdünnung 1:5.000	803	-	-	-

^a angegeben sind Kopienzahlen pro ml (Mediane)

^b angegeben sind Werte in pg; in Klammern aufgeführt sind die rechnerisch abgeschätzten Zellzahlen (6pg DNA/Zelle)

Aufgrund der geringen Virus-Kopienzahlen in den Überständen trotz scheinbar vonstatten gehender Replikation wurden im Folgenden weitere Versuche durchgeführt, die eventuelle Effekte der Stimulation auf Zellebene beleuchten sollten. Dafür wurden die sechs Tage lang stimulierten Zellen nicht mittels PCR, sondern mit Hilfe eines Gardella-Gels analysiert. Auf diese Weise könnte trotz insgesamt gleich bleibender Kopienzahlen in den Zellen eine Verschiebung des Verhältnisses von zirkulärem zu linearem Genom festgestellt und damit eine gesteigerte Produktion von Viruspartikeln durch die Applikation einzelner Substanzen gezeigt werden. Auch die Überstände sollten hierbei berücksichtigt werden: Sie wurden zunächst ultrazentrifugiert, das erhaltene ‚Viruspellet‘ in Probenpuffer resuspendiert und anschließend ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Als Negativkontrolle dienten auch hier die L52-Zellen. Bei diesen Versuchen, die jeweils zweimal durchgeführt wurden, wurden insgesamt zehn Chemikalien bzw. Chemikalienkombinationen verwendet, die z.T. noch nicht an den L23-Zellen ausprobiert worden waren, in den Versuchen mit primären PBMC allerdings einen positiven Effekt hatten. In der Abbildung 17 sind die Ergebnisse jeweils eines Ansatzes beider Versuche dargestellt. Es zeigten sich wie auch schon in den Vorversuchen Schwankungen der Signalintensität des linearen Genoms; diese waren jedoch in keinem Fall eindeutig reproduzierbar, so dass sie vermutlich nicht auf die Stimulation der Zellen, sondern auf unbekannte Einflüsse oder auch technische Artefakte (z.B. unterschiedlich effiziente Lyse der Zellen bzw. Kapside auf dem Gel) zurückzuführen sind. In beiden untersuchten Ansätzen der Stimulation mit Ionomycin sowie TPA + Cyclosporin A (Spuren II und III in Abb. 17b) dagegen ist ein leichter Trend zur Vermehrung des linearen Genoms erkennbar. Eine eindeutige Reaktivierung, vergleichbar der von TPA-stimulierten B95-8-Zellen [s. Abb. 16a, S. 98], ist jedoch nicht erkennbar. Auch in den Überständen ist bei keiner der zehn verwendeten Substanzen ein Signal zu erkennen. Keines der hier verwendeten Stimulanzien vermag also eine fulminante Reaktivierung der Viren in den L23-Zellen zu bewirken.

Abbildung 17 Gardella-Gel-Analyse von stimulierten L23-Zellen



Jeweils 3×10^6 L23-Zellen sowie deren ultrazentrifugierte Überstände wurden nach drei Tagen Stimulation mit verschiedenen Chemikalien in einem Gardella-Gel analysiert (jeweils erste Spur: Zellen, zweite Spur: Überstand).

- (a) Spuren 1: unstimuliert; Spuren 2: TPA (20ng/ml); Spuren 3: TPA (20ng/ml) + n-Butyrat (3mM); Spuren 4: TPA (20ng/ml) + Dexamethason (5 μ g/ml); Spuren 5: Cyclosporin A (1 μ g/ml); Spuren 6: anti-Ig-Antikörper (1:500); Spur 7: L52-Zellen (3×10^6)
- (b) Spuren I: unstimuliert; Spuren II: Ionomycin (1 μ M); Spuren III: TPA (20ng/ml) + Cyclosporin A (1 μ g/ml); Spuren IV: Dexamethason (5 μ g/ml); Spuren V: Lipopolysaccharide (5 μ g/ml); Spuren VI: TNF α (10ng/ml); Spur VII: L52-Zellen (3×10^6)